

М. А. Тер-Карапетян, чл.-корресп. АН Армянской ССР

**О количественных отношениях между усвоенным сахаром,
 синтезируемой биомассой и выделенным углекислым газом
 при аэробной ассимиляции глюкозы и ксилозы
 дрожжевыми организмами**

(Представлено 11.VIII.1955)

Аэробная жизнедеятельность — это способ существования, при котором основной путь обмена веществ аэробных микроорганизмов происходит в направлении биосинтеза протоплазмы; при этом выделяется в среду значительное количество углекислого газа и некоторые продукты диссимиляции.

Исследования процессов биосинтеза проводятся или путем обнаружения цепей биохимических реакций синтеза составных частей протоплазмы (аминокислоты, углеводы, жиры, витамины, ферменты и т. п.) или же путем изучения роста и развития клеток в целом. Последний метод был применен в нижеприведенных исследованиях.

В настоящей работе мы поставили задачу — изучить количественные отношения между усвоенным сахаром (источник углерода), с одной стороны, и синтезируемой биомассой и выделенным культурой углекислым газом, с другой, в условиях аэробного метаболизма.

Упомянутые отношения отражают динамику и совокупность реакций превращения метаболитов и степень включения их осколков или элементарных частей в синтезируемую биомассу.

Для дрожжевых организмов известны только некоторые подробные исследования относительно суммарных уравнений, связывающих усвоенный субстрат с синтезируемой биомассой и выделенным CO_2 при аэробной ассимиляции гексозов (¹⁻⁵). Что касается ассимиляции пентозов, то убедительные положения по этому вопросу отсутствуют до сих пор.

Методика исследования: дрожжевые организмы культивировались в синтетической среде следующего состава: глюкоза или ксилоза (хим. чист.) 10,0 г, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,14 г; KH_2PO_4 — 0,83 г, $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 1,00 г, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ — 0,10 г, Zn^{++} (из $\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) — 60γ, Fe^{++} (из $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) — 100 γ, вода водопроводная — 1 л.

Эта среда, называемая в дальнейшем основной средой, дополнялась экстрактом солодовых ростков, являющимся хорошим источником витаминов и микронутриентов. Экстракт получался путем кипячения 3 г солодовых ростков в 100 мл водопроводной воды в течение 30 мин. Он употреблялся после тщательного осветления в количестве 33,3 мл (соответствующего 1 г ростков) в 1 литре среды. Такое количество экстракта содержит 17 мг органического азота, из коих 5 мг амидного азота аспарагина и 116 мг органического углерода, из коих 14,6 мг аспарагинового. В нижеприведенных опытах эта доза экстракта была применена в одинарном, двукратном и десятикратном количествах. Все компоненты среды использовались в виде предварительно простерилизованных растворов.

Музейная культура на агаре с 1% ксилозой дрожжевых организмов из рода *Candida** пассажировалась однократно на опытной жидкой среде с глюкозой или ксилозой в течение 18—24 часов. Молодая культура центрифугировалась, промывалась холодной водой и засеивалась из расчета от 8 ± 2 мг сухой массы на 100 мл среды.

Опыты производились в специальных Т-образных сосудах (6) с барботером, через который проходит ток воздуха, предварительно очищенный от атмосферного CO_2 . Образующийся в культуре CO_2 поглощался в серии поглотителей, заполненных 1 N раствором NaOH общим объемом от 25 до 40 мл. В конце опыта содержимое поглотителей объединялось и CO_2 определялся ацидиметрией в присутствии фенолфталеина после осаждения карбонатов 20 мл 10% раствора BaCl_2 .

Для каждого опыта употреблялась среда от 40 до 60 мл, из коих бралось в начале и в конце по 2 мл для определения редуцирующих веществ (р. в.). В конце опыта дрожжи отделялись центрифугированием, трехкратно промывались холодной водой и высушивались при 100° до постоянного веса. Результаты как анализа сахаров, так и взвешивания сухой биомассы пересчитывались на первоначальный объем среды.

Продолжительность опытов колебалась от 9 до 12 час., температура поддерживалась и $34 \pm 1^\circ\text{C}$, а pH — в пределах 4—5.

Экспериментальные результаты, приведенные в табл. 1, позволяют сделать следующие заключения.

1. При аэробной ассимиляции испытанных сахаров синтезируется в основной среде, дополненной одной дозой экстракта ростков, 48,4% биомассы из глюкозы, а из ксилозы — 57,1% усвоенного количества сахара. Одновременно выделяется CO_2 в средах с глюкозой 65,1% и с ксилозой 71% также усвоенного количества сахара.

*) Систематическое исследование этого штамма проводится в нашей лаборатории Ш. А. Авакян.

Таблица 1

Источник углерода	Экстракт ростков в. доз.	Исходный сахар мг	Усвоен. сахар мг	Синтезир. биомасса мг	Выделен. CO ₂ мг	Биомасса	CO ₂	CO ₂
						р. в. %	р. в. %	биомасса %
Глюкоза	1	555	545	257	358	47,1	65,6	138
	1	570	540	273	340	48,7	60,7	125
	1	504	498	246	344	49,4	69,0	139
	средн.					48,4	65,1	134
	2	325	322	164	224	50,9	69,5	137
	10	492	469	259	385	55,2	82,1	148
	10	498	481	270	426	56,1	88,6	158
	10	486	472	263	346	55,7	73,2	132
	средн.					55,6	81,3	146
	Ксилоза	1	514	466	269	321	57,7	69,0
1		450	417	238	296	57,6	71,0	124
1		481	458	260	334	56,7	72,9	128
средн.						57,1	71,0	124
2		496	482	280	327	58,0	67,8	117
10		520	509	330	402	64,8	79,0	122
10		580	556	360	424	64,7	76,2	118
средн.					64,8	77,6	120	
Ксилозная среда		Продолжение инкубации после истощения сахара			22	—	—	—

2. Увеличение количества экстракта ростков значительно повышает как синтезируемую биомассу, так и выделение CO₂. Так, например, применение десятикратной дозы экстракта ростков повышает, с одной стороны, выход биомассы в средах с глюкозой от 48,4 до 55,6% и с ксилозой — от 57,1 до 64,8%, а с другой стороны, выделение CO₂ в средах с глюкозой от 65,1 до 81,3% и с ксилозой — от 71 до 77,6% усвоенных сахаров.

3. После истощения сахара, при продолжении инкубации культуры в течение еще 10 часов в среде, содержащей только продукты диссимиляции, выделяется около 22 мг CO₂. Это указывает на то, что продолжение инкубации на несколько часов после истощения основного источника углерода вносит только незначительные ошибки в количество выделенного CO₂.

Для обсуждения полученных экспериментальных материалов в табл. 2 сопоставлены условия и результаты наших опытов с наиболее известными в литературе данными по синтезу биомассы дрожжевых организмов при аэробных условиях.

Такое сопоставление приводит нас к определенным новым представлениям о закономерностях аэробной ассимиляции глюкозы и ксилозы дрожжевыми организмами.

1. Синтез биомассы на 48,4% усвоенной глюкозы в основной среде, дополненной одной дозой экстракта, совпадает с результатами Финка и Кребса⁽²⁾, получивших выход биомассы в размере 49%.

Таблица 2

	Наши опыты		Ольсон и Джонсон (5)	Финк и Кребс (2)	
	экстракт 1 доза	экстракт 10 доз		большинство вариантов	варианты 22/23
Составные части среды (мг на 1 г сахара)					
Общий N	52,7	68,2	126	51,0	62,7
Аммиачный N	51,0	51,0	73	51,0	51,0
Амидный N	0,5	5,0	53	—	3,3
Органич. N (общий—аммиачн.) .	1,7	17,2	53	—	8,4
Общий С	411,6	516,0	514	400	438
С сахара	400,0	400,0	400	400	400
С биол. активаторов	11,6	116,0	114	—	38
Синтезируемая биомасса (% усвоен. сахара)					
Глюкоза	48,4	55,6	53	49	53,5
Ксилоза	57,1	64,8	—	46—49*	51,5*
Выделение CO₂ (% усвоен. сахара)					
Глюкоза	65,1	81,3	—	55,8	47,7
Ксилоза	71,0	77,6	—	—	—
* Опыты Лехнера (7)					

Однако в работе этих исследователей хотя и указывается на применение „чистой минеральной среды“, но, по всей вероятности, в их опытах внесены в среду следы источников органического азота и углерода, содержащихся в большом количестве посевного материала (не менее 10% ожидаемого урожая), который получен на производственной гидролизной среде и не был подвержен промыванию. К такому же заключению относительно этих опытов пришли Одинцова (8) и Круковская (9), которые показали, что витамин В₁ и аспарагин активируют размножение *Torulopsis utilis* в синтетической минеральной среде.

2. Наши опыты в среде, содержащей десятикратную дозу экстракта, показывают, что наличие в среде высоких доз аспарагина (100—250 мг на 1 г сахара) не является, как предполагают Ольсон и Джонсон (5) необходимым условием для получения выхода биомассы 53% усвоенной глюкозы. Совместно с Г. С. Арутюнян и С. Л. Мхитарян нами доказано, что дополнение основной глюкозной среды 2,5-кратной дозой экстракта ростков, содержащей только 10 мг аспарагина на 1 г сахара (и вместе с этим ничтожные дозы других активаторов), обеспечивает как максимальное накопление дрожжевой биомассы (52—53%), так и общего азота в ней ($N \times 6,25 = 50—55\%$).

3. Наши результаты по синтезу биомассы дрожжей на 57,1% усвоенной ксилозы в основной среде, заполненной одной дозой экст-

ракта, отличаются от результатов других исследователей, где, хотя и иногда отмечаются высокие выходы биомассы из ксилозы (¹⁰), тем не менее ими не установлено существенное различие между степенями синтеза биомассы при усвоении глюкозы и ксилозы (⁷). Основными недостатками известных опытов по синтезу биомассы при аэробной ассимиляции ксилозы являются большие колебания, показываемые одной и той же культурой дрожжей как в коэффициенте усвоения, так и в степени синтеза биомассы из определенного количества усвоенной ксилозы. Так, например, коэффициент усвоения колеблется от 27 до 99% (¹⁰, ¹²) и степень синтеза биомассы — от 26 до 54% (¹¹, ¹²) усвоенного сахара. Недочетом является и то, что большинство опытов приведено в средах со смесью глюкозы и ксилозы (¹¹) и с нечистой ксилозой (⁷, ¹⁰) из древесных гидролизатов, в то время как высокий выход биомассы дрожжей в среде с химически чистой ксилозой считается трудно осуществимой задачей (⁷, ¹³).

В наших серийных опытах, проведенных одним и тем же штаммом в среде с чистой ксилозой (Т пл. 145°), степень синтеза биомассы постоянна в пределах $\pm 2\%$, а коэффициент усвоения сахара всегда превышает 90% (в среднем 95%). Такие результаты надо приписать биологическим свойствам применяемого штамма, который в процессе своего филогенетического развития отлично адаптирован к усвоению ксилозы в качестве единственного источника углерода.

4. Сопоставление величины отношения $\frac{\text{CO}_2}{\text{синтезируемая биомасса}}$ для глюкозы и для ксилозы с величинами отношения $\frac{\text{синтезируемая биомасса}}{\text{усвоенный сахар}}$ (табл. 1) показывает, что хотя абсолютные количества выделенного CO₂ и близки для обоих сахаров, тем не менее количество осколков или элементарных частей субстрата, идущего на синтез биомассы, больше в случае ксилозы, чем глюкозы.

Эти результаты могут быть отнесены к следующим трем предположениям: отсутствию образования этилового спирта испытуемым штаммом, особенностям реакции окисления и расщепления ксилозы или фиксации части выделенного CO₂. Последние возможности выдвигаются нами в качестве рабочей гипотезы для дальнейших исследований.

Вышеприведенные данные по синтезу биомассы при аэробной ассимиляции ксилозы дают основание для установления новых норм выходов биомассы из ксилозной фракции естественных сред (гидролизаты и т. п.), в зависимости от количества содержащихся в них биологических активаторов и вторичных источников азота и углерода.

Институт животноводства
Министерства сельского хозяйства
Армянской ССР

Շաքարասնկային օրգանիզմների կուլմից գլյուկոզայի և քսիլոզայի անբոբ ասիմիլյացիայի բնրացրում յուրացված շաքարի, սինթեզված բիոմասայի և արտադրված ածխաթթու զազի քառակական հարաբերությունների մասին

Շաքարասնկերի անբոբ կենսադործունեության ընթացքում հիմնականում սինթեզվում է բջջային բիոմասա, իսկ միջավայրում արտադրվում են ածխաթթու զազ և դիս-սիմիլյացիոն նյութեր:

Տվյալ պայմաններում կուլտուրայի կողմից յուրացված շաքարի, սինթեզված բիոմասայի և արտադրված ածխաթթու զազի փոխհարաբերությունների ուսումնասիրությունն ունի կարևոր տեսական և դործնական նշանակություն:

Վերոհիշյալ հարաբերությունները մեր կողմից հետազոտվել են անբոբ պայմաններում գլյուկոզայի և քսիլոզայի յուրացման դեպքում: Դրված փորձերի արդյունքները, որոնք բերվել են ադ. 1-ում և ադ. 2-ում ցույց են տալիս հետևյալը՝

1. Սինթեզված շաքարասնկային բիոմասան, նայած միջավայրում գտնված բիոլոգիական ակտիվատորների քանակին, հասնում է յուրացված գլյուկոզայի 18,4—55,6 տոկոսին և յուրացված քսիլոզայի 57,1—64,8 տոկոսին: Միաժամանակ կուլտուրան արտադրում է CO₂, յուրացված գլյուկոզայի 65—81 տոկոսի իսկ քսիլոզայի 71—77 տոկոսի շափով:

2. Ապացուցված է, որ ուսումնասիրված շաքարասնկերի ցեղի օպտիմալ զարգացումը պահանջում է փոքր քանակներով ազոտի և ածխածնի օրգանական միացություններ, որոնց թվում մոտ 10 մգ. ասպարագին 1գ շաքարի դիմաց:

3. Ստացված արդյունքները հնարավորություն են տալիս հաստատելու, որ բնական միջավայրերի քսիլոզային ֆրակցիայից սինթեզված բիոմասայի քանակը կանգնած է ավելի բարձր մակարդակի վրա, քան այդ ընդունված է մինչև այժմ, այն է 57—64 տոկոս, համեմատած յուրացված շաքարի քանակի հետ:

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Г. Клаасен, Biochem. Z. 275, 350, 1934. ² Г. Финк и Я. Кребс, Biochem. Z. 299, 1, 1938. ³ Г. Финк, Я. Кребс и Р. Лехнер, Biochem. Z. 301, 143, 1939. ⁴ К. ван-Ниль и А. Козн, J. Cell. and Comp. Physiol. 20, 95, 1946. по Ann. Rev. Biochem. 15, 452, 1946. ⁵ Б. Ольсон и М. Джонсон, J. Bact. 57, 235, 1949. ⁶ М. А. Тер-Карапетян, Известия АН АрмССР (серия биолог.), 8, № 11, 33, 1955. ⁷ Р. Лехнер, Biochem. Z. 301, 170, 1939. ⁸ Е. Одинцова, Микробиол. 8, 321, 1940. ⁹ Г. Круковская, Микробиол. 9, 921, 1940. ¹⁰ Р. Лехнер, Biochem. Z. 300, 204, 1939. ¹¹ Р. Лехнер и Р. Иллиг, Biochem. Z. 300, 28, 1938. ¹² Е. Плевако, Получение кормовых дрожжей на гидролизатах сельскохозяйственных отходов. Пищепромиздат, 1940. ¹³ Ш. Авакян, диссертация. Ереван, 1954.